

Seemann

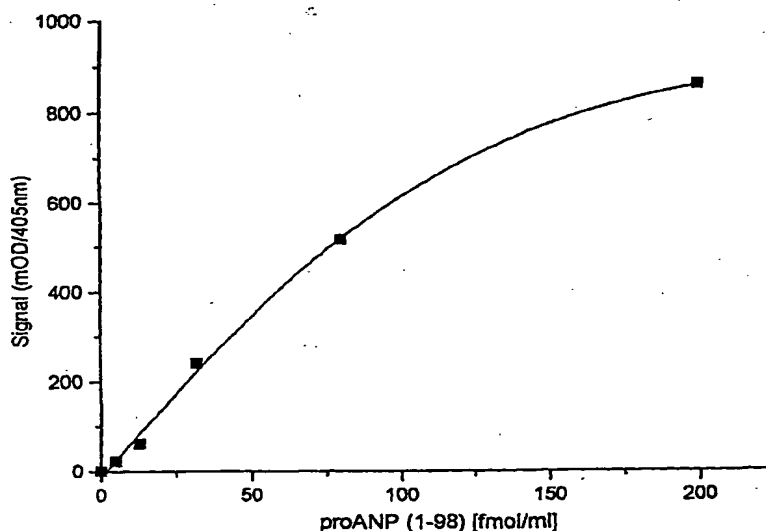


**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>G01N 33/68</b>		<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/19207</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	6. April 2000 (06.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/AT99/00230</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>28. September 1999 (28.09.99)</b>		<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: A 1618/98      29. September 1998 (29.09.98)    AT			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOMED-ICA GESELLSCHAFT MBH [AT/AT]; Divischgasse 4, A-1210 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WOLOSZCZUK, Wolfgang [AT/AT]; Wlassakstrasse 26, A-1130 Wien (AT). MISS-BICHLER, Albert [AT/AT]; Marokkanergasse 3/2/3/62, A-1030 Wien (AT).			
(74) Anwälte: ITZE, Peter usw.; Amerlingstrasse 8, A-1061 Wien (AT).			

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE (ANP)

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON ATRIALEM NATRIURETISCHEM PEPTID (ANP)



(57) Abstract

The invention relates to a method for identifying atrial natriuretic peptide (ANP). According to said method, polyclonal antibodies are used against epitopes of the pro-ANP (1-98) which are defined as immunogens 1, 2 and 3 (SEQ.ID.Nos. 1, 2 and 3). Said antibodies specifically bind these immunogens and recombinant pro-ANP (1-98).

#### (57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung von Atrialelem Natriuretischem Peptid (ANP), wobei polyklonale Antikörper gegen Epitope des pro ANP (1-98) eingesetzt werden, die als Immunogene 1, 2 und 3 (SEQ.ID.Nr. 1, 2 und 3) definiert sind, und die diese Immunogene sowie rekombinantes pro ANP (1-98) spezifisch binden.

#### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Verfahren zur Bestimmung von Atriale Natriuretischem Peptid (ANP)

5

Die gegenständliche Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung von Atriale Natriuretischem Peptid (ANP) und weiters auf eine In-vitro diagnostische Nutzung spezifischer polyklonaler Antisera gegen das 98 Aminosäuren lange N-terminale Fragment (proANP 1-98) des humanen 10 pro-Atriale Natriuretischen Peptids (126 Aminosäuren) und seiner Analoga im Veterinärbereich.

#### Klinische Bedeutung Natriuretischer Peptide

Das Atriale Natriuretische Peptid (ANP), Brain Natriuretisches Peptid (BNP) 15 und C-type natriuretisches Peptid (CNP) gehören zu einer Familie von Hormonen, die aus dem Herz-Vorhof, dem Ventrikel des Herzens und den vaskulären Endothelzellen sezerniert werden (1-3). ANP wird in den Myocyten als Prohormon mit einer Länge von 126 Aminosäuren gespeichert. Zum Zeitpunkt der Freisetzung wird das Prohormon in einen N-terminalen Teil von 98 Aminosäuren proANP (1-98) 20 und das biologisch aktive  $\alpha$ -ANP (1-28) zu gleichen Teilen gespalten (3). proANP hat eine deutlich längere Halbwertszeit im Plasma als  $\alpha$ -ANP, das nur eine sehr kurze Halbwertszeit von 2,5 Minuten aufweist (2) und liegt in bis zu 50-fach höherer Plasmakonzentration als  $\alpha$ -ANP vor (2-4). Weil die zirkulierenden Konzentrationen von immunreaktivem proANP wenig sensitiv auf rasche biologische Fluktuationen 25 von  $\alpha$ -ANP reagieren, spiegeln sie die Gesamtmenge des sezernierten ANP wieder.

Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, daß die natriuretischen Peptide den Organismus gegen Flüssigkeitsüberschuß und hohen Blutdruck schützen (5). Die biologische, biochemische und pathophysiologische Rolle der natriuretischen Peptide ist in Übersichtsarbeiten zusammengefaßt (6,7).

### Klinische Wertigkeit

Die Plasmakonzentration von proANP ist bei Patienten mit verschiedenen Formen des erworbenen Bluthochdrucks erhöht, besonders wenn der Blutdruck infolge einer Hypertrophie des linken Ventrikels sehr hoch ist. Nach einem 5 Herzversagen steigt die Plasmakonzentration von proANP in Relation zum Ausmaß der Schädigung des Herzens. Nach einem akuten Myokardinfarkt steigen die Konzentrationen aller natriuretischen Peptide schnell an.

In all diesen erwähnten pathophysiologischen Zuständen sind die zirkulierenden Konzentrationen der natriuretischen Peptide erhöht. Dies ist ein Schutzmechanismus 10 des Organismus gegen Gefäßverengung und Natriumretention. Weiters wurde bewiesen, daß die Plasmakonzentration von proANP bei Patienten mit Herzfehlern in Relation zur Schwere des Herzfehlers erhöht ist und daher wesentlich zur Prognose beiträgt. Von besonderem Interesse ist die Beobachtung in vielen Studien, daß die Plasmakonzentration von proANP sogar in asymptomatischen Patienten mit 15 linksventrikulärer Dysfunktion signifikant erhöht ist und daher eine wichtige klinische Wertigkeit als nicht-invasiver Marker hat (9,10,11). Weiters ist eine deutliche Unterscheidung von gesunden Kontrollpersonen und NYHA Klasse I Patienten gezeigt worden (12). Daher ist die Entwicklung von Methoden zur spezifischen und exakten Messung der proANP Fragmente von höchstem 20 medizinischem Interesse.

### Stand der Technik

Die einzige kommerziell zur Verfügung stehende Meßmethode zur Bestimmung von proANP (1-98) basiert auf einem Radioimmunoassay (RIA) der Fa. BIOTOP, 25 der die üblichen Nachteile kompetitiver und radioaktiver Assays aufweist wie spezielle Räumlichkeiten für radioaktives Arbeiten, Entsorgungskosten und häufig auch schlechte Reproduzierbarkeit wegen hoher Anfälligkeit auf Variation der Probenmatrix. Eine Alternative zu oben genanntem RIA wurde von SHIONOGI- & Co. LTD. präsentiert (EP 0 721 105 A1). Dabei wurden monoklonale Antikörper 30 gegen die Positionen 1-25 und 43-66 hergestellt und zum Aufbau eines radioaktiven

oder enzymatischen Sandwich-Immunoassays eingesetzt. Die Verwendung monoklonaler Antikörper bedingt jedoch teure und methodisch aufwendige Zellkultur (Herstellung der Maus-Hybridoma oder in vitro Produktion) bzw. die Gewinnung der Antikörper aus dem Speichel von Mäusen nach intraperitonealer Verabreichung der Hybridoma, was die erzielbaren Antikörperausbeuten limitiert und die Methodik ebenfalls stark erteuert.

Daher war es nötig, eine Methodik zu entwickeln, welche die kostengünstige Produktion größerer Antikörpermengen (polyklonal) bei zu monoklonalen Techniken gleichwertiger Spezifität zur Nutzung in einem Sandwich Immunoassay erlaubt.

10 Gemäß der Erfindung werden polyklonale Antikörper gegen Epitope des proANP (1-98) eingesetzt, die als Immunogene 1, 2 und 3 definiert sind, und die diese Immunogene sowie rekombinantes proANP (1-98) spezifisch binden. Damit ist es möglich, einfach und zuverlässig ANP nachzuweisen und damit Herzerkrankungen bereits in frühem Stadium verlässlich zu diagnostizieren.

15 Zur leichten Auffindbarkeit werden die Antikörper mit einem Marker-Molekül versehen, wobei bevorzugt als Markermolekül eine fluoreszierende Substanz, ein Enzym oder ein Farbstoff eingesetzt wird.

Zum Nachweis von humanem oder tierischem proANP (1-98) kann Körperflüssigkeit mit einer Lösung, die einen der polyklonalen Antikörper gegen Immunogen 1, 2 oder 3 enthält, zur Bildung eines Antikörper/proANP(1-98)-Komplex in Kontakt gebracht werden, wonach dann die Bildung des Komplexes nachgewiesen wird. Dabei kann der Nachweis des Antikörper/proANP(1-98)-Komplex durch Reaktion mit einem der beiden anderen Antikörper in Form eines Sandwich-Assays durchgeführt werden. Besonders 25 zuverlässig ist das erfindungsgemäße Verfahren, wenn ein primärer, gegen eines der Immunogene gerichteter Antikörper an einer Festphase immobilisiert wird, wobei zur Reaktion als sekundärer Antikörper einer der gegen eines der beiden übrigen Immunogene gerichteter Antikörper eingesetzt wird. Die Immobilisierung des primären Antikörpers kann dabei an einer Mikrotiterplatte, einer Membrane oder 30 Festkörperpartikeln erfolgen.

Ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann folgende Komponenten enthalten:

- a) einen immobilisierten primären Antikörper,
- b) rekombinantes proANP (1-98) als Standard,
- 5 c) einen polyklonalen sekundären Antikörper oder einen markierten Detektionsantikörper, der spezifisch an den genannten polyklonalen sekundären Antikörper bindet.

Die Erfindung beinhaltet somit die Auswahl geeigneter Teilsequenzen des N-terminalen Fragmentes als Immunogene, die mittels numerischer Methoden  
10 hinsichtlich ihrer Antigenizität optimiert wurden und gleichzeitig minimale Kreuzreaktionen mit anderen physiologisch zirkulierenden N-terminalen Fragmenten (proANP (1-30), proANP (31-67)) aufweisen. Weiters die Entwicklung eines Sandwich Immunoassays für proANP (1-98) (Analyt) unter Verwendung immunaffinitätschromatographisch gereinigter polyklonaler Antikörper gegen  
15 Teilstrukturen des Analyten. Die Methode zur Messung des Analyten beinhaltet folgende Schritte:

Inkubation der zu untersuchenden Probelösung mit einem gegen eine Teilstruktur des Analyten gerichteten polyklonalen Antikörper und einem markierten polyklonalen Zweitantikörper gegen eine andere Teilstruktur des Analyten und  
20 Detektion des gebildeten Antigen-Antikörper Komplexes.

Neben dem Einsatz polyklonaler Antisera gegen Teilsequenzen von proANP (1-98) und deren In-vitro diagnostische Nutzung sowie die Auswahl geeigneter Teilsequenzen des N-terminalen Fragmentes als Immunogene betrifft der vorliegende Gegenstand die chemische Synthese dieser Immunogene, sowie die Immunisierung  
25 von Trägartieren (vorzugsweise von Schafen). Des weiteren wurden die immunaffinitätschromatographische Reinigung der Rohseren, die Konjugation der gewonnen Antikörper mit einem Markermolekül (z.B. Enzyme, Biotin, kolloidales Gold, fluoreszierende oder lumineszierende Substanzen sowie Radioisotope) und das Austesten der geeignetsten Antikörper-Kombinationen zum Nachweis von proANP

(1-98) als Sandwich Immunoassays durchgeführt. Letzterer kann in folgenden Ausformungen durchgeführt werden:

Das polyklonale Erstserum enthält Antikörper gegen Epitope der Teilsequenz 8-27 und das Zweitserum Antikörper gegen Epitope der Teilsequenz 79-98 oder 31-67. Der Nachweis erfolgt durch Detektion des resultierenden Antigen-Antikörper Komplexes.

Das polyklonale Erstserum enthält Antikörper gegen Epitope der Teilsequenz 79-98 und das Zweitserum Antikörper gegen Epitope der Teilsequenz 8-27 oder 31-67. Der Nachweis erfolgt durch Detektion des resultierenden Antigen-Antikörper Komplexes.

Das polyklonale Erstserum enthält Antikörper gegen Epitope der Teilsequenz 31-67 und das Zweitserum Antikörper gegen Epitope der Teilsequenz 8-27 oder 79-98. Der Nachweis erfolgt durch Detektion des resultierenden Antigen-Antikörper Komplexes.

15 In einer weiteren Ausführung sind die Antikörper des jeweiligen Zweitserums mit einem Enzym, Biotin, kolloidalem Gold, einer fluoreszierenden oder lumineszierenden Substanzen oder Radioisotopen markiert.

Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung in vorteilhafter Weise (1) eine Methode zur Herstellung polyklonaler Antisera gegen proANP(1-98) mit zu 20 monoklonalen Antikörpern equivalenter Spezifität (2) einen Sandwich-Immunoassay für biologisch inaktives proANP (1-98) und (3) polyklonale Antisera gegen biologisch inaktives proANP (1-98) zum Einsatz in der Histologie und (4) einen Immunoassay-Kit für biologisch inaktives proANP (1-98), der diese Antisera enthält, zur Verfügung.

25

Figur 1 zeigt eine typische Standardkurve eines Sandwich-ELISA für proANP (1-98)

Figur 2 zeigt die Bestimmung von proANP (1-98) Konzentrationen im Blut von Patientenproben mit unterschiedlich schwerer Herzerkrankung (NYHA I-IV)

30

Tabelle 1 zeigt die Kreuzreaktivität des proANP (1-98) ELISA mit anderen N-Terminalen natriuretischen Peptidfragmenten.

#### Auswahl und Herstellung der Immunogene - Immunsierung

5

Die geforderte hohe Spezifität und Avidität der gewünschten Antisera kann nur durch entsprechende Auswahl der für die Immunisierung von Trägartieren verwendeten Immunogene erzielt werden. Die zu lösenden Probleme liegen in:

- a) der Wahl eines ausreichenden Sequenz-Abstandes zwischen den zur  
10 Immunisierung verwendeten Peptiden, um Kreuzreaktivitäten mit anderen natürlich vorkommenden proANP-Fragmenten zu vermeiden.
- b) die geeignetste Sequenz für optimale Immunantwort und Spezifität zu finden
- c) eine möglichst genaue Überwachung der Immunantwort der Trägartiere durchzuführen, um den geeignetsten Zeitpunkt für eine Nachimmunisierung zu  
15 bestimmen damit die produzierten Antisera optimale Avidität besitzen.

Daher wurden zur Analyse des Analyten (proANP (1-98) numerische Methoden (Software: PeptiSearch von CoshiSoft Arizona USA), welche die Bestimmung der Antigenizität (Algorithmen nach Jameson-Wolf und Welling)  
20 eingesetzt um polyklonale Antisera maximaler Avidität zu erhalten. Als Regionen höchster Antigenizität konnten die Sequenzen 14-24 (DFKNLLDHLEE) und 79-95 (SSDRSALLKSKLRALLT) identifiziert werden.

Davon ausgehend wurden folgende synthetischen Immunogene im Auftrag von BIOMEDICA bei Guildhay Lt. , Walnut Tree Close, Guilford, Surrey GU1 4UG,  
25 ENGLAND zur Immunisierung von Schafen eingesetzt:

Immunogen 1: Aminosäuresequenz 8-27 bezogen auf proANP (SEQ.ID Nr. 1)

Immunogen 2: Aminosäuresequenz 31-64 bezogen auf proANP (SEQ.ID.Nr.

2)



Immunogen 3: Aminosäuresequenz 79-98 bezogen auf pro ANP  
(SEQ.ID.Nr.3)

Sequenzprotokoll:

5	<110>	Biomedica GmbH									
	<120>	Polyklonale Antisera zum Nachweis von ProANP (1-98)									
	<140>	AT A 1618/98									
	<141>	29.09.1999									
	<160>	3									
10	<210>	1									
	<211>	20									
	<212>	PRT									
	<213>	Homo Sapiens									
	<400>	Ser	Asn	Ala	Asp	Leu	Met	Asp	Phe	Lys	Asn
		1				5					10
		Leu	Leu	Asp	His	Leu	Glu	Glu	Lys	Met	Pro
						15					20
15	<210>	2									
	<211>	34									
	<212>	PRT									
	<213>	Homo Sapiens									
	<400>	Glu	Val	Val	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Ser	Glu
20		1				5					10
		Pro	Asn	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser
						15					20
		Pro	Leu	Pro	Glu	Val	Pro	Pro	Trp	Thr	Gly
						25					30
		Glu	Val	Ser	Pro						
25	<210>	3									
	<211>	20									
	<212>	PRT									
	<213>	Homo Sapiens									
	<400>	Ser	Ser	Asp	Arg	Ser	Ala	Leu	Leu	Lys	Ser
		1				5					10
		Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Thr	Ala	Pro	Arg
						15					20

Alle Peptide wurden durch organisch-chemische Schutzgruppen-Synthese nach dem Stand der Technik hergestellt und entweder N-terminal oder C-terminal mit Thyreoglobulin als Trägerprotein gekoppelt. Als Kopplungsreagenzien können beispielsweise bifunktionelle Verbindungen wie 4-(N-Maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate (SMCC), Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS), Succinimidyl 4-(p-Maleimidophenyl)butyrate (SMPB) ebenso Sulfo-MBS, Sulfo-SMCC oder ähnliches eingesetzt werden.

Mit diesen Immunogenen wurden Schafe einer primären Immunisierung durch Verabreichung des Peptides in Mischung mit komplettem Freundschem Adjuvans unterzogen. Die Immunantwort wurde mittels eines Antikörper Capture ELISAs untersucht, bei dem mit dem zur Immunisierung verwendeten Trägerpeptid beschichte Microtiterplatten verwendet wurden. Verdünnungsreihen einer frisch gewonnenen Serumprobe der Schafe wurden mit diesen Microtiterplatten inkubiert und die spezifische Bindung der Antikörper mit einem Anti-Schaf-Peroxidase -IgG Konjugat quantifiziert.

Der Antikörper Titer der Schafe wurde monatlich überprüft und bei Absinken des Titers erfolgten entsprechende Nachimmunisierungen in jeweils optimalen Intervallen.

20

#### Gewinnung der polyklonalen Sera - Immunaффintiätschromatographie

Die aus den Schafen gewonnenen Rohsera wurden durch Affinitätschromatographie über HiTrap Minisäulen (PHARMACIA, Schweden) gereinigt. Etwa 0.5mg des entsprechenden zur Immunisierung verwendeten Peptides wurde entsprechend dem von Pharmacia mitgelieferten Protokolls an die Säulen gebunden. Nach Filtration der Rohsera durch ein 0.45µm Millex-Filter (MILLIPORE, USA) wurden 10-20 ml Antiserum 1+2 (v/v) mit 50 mM Borat Puffer pH 7 verdünnt und bei Raumtemperatur mit einer Flußrate von 0.5 ml/min auf die Säule geladen. Die Elution der spezifisch gebundenen Antisera erfolgte mit 0.1M Citrat-Puffer pH 1.7 mit einer Flußrate von 1ml/min. Die Elution wurde

mittels eines 280nm UV-Detektors überwacht und Fraktionen zu 0.5ml Antiserum auf 0.5ml vorgelegten 0.5M Boratpuffer pH 10 gesammelt, um eine sofortige Neutralisation des Eluates zu erreichen. Die Bestimmung der IgG-Konzentration des Eluates erfolgte mit einem handelsüblichen Protein Nachweis ( $\mu$ BCA von PIERCE, 5 NL)

Als Standardmaterial wurde recombinantes proANP(1-98) exprimiert in E. Coli vom Institut für Mikrobiologie der Universität Wien verwendet.

#### Beispiele

10

Die beschriebenen polyklonalen Antisera gegen die Immunogene 1-3 der vorliegenden Erfindung können für alle bekannten Varianten von Immunoassays wie

a) Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) einschließlich automatisierter Hybrid-Methoden (z.B: unter Verwendung von Polystyrol oder Latex-Beads) in

15 Microtiterplatten oder auf Membranen

b) Fluoreszenz Immunoassays (FIA)

c) Diverse Teststrip-Methoden auf Trockenchemie-Basis

d) Histologischem Nachweis auf unterschiedlichen Gewebepräparationen eingesetzt werden.

20 Einige Ausführungen werden im Folgenden durch Beispiele beschrieben:

#### Beispiel 1

Sandwich ELISA für ProANP (1-98)

25

Aliquote der gereinigten Sera gegen Immunogen 1,2 und 3 wurden mit Biotin unter Verwendung von Biotinamidocaproate-N-Hydroysuccinimide Ester oder ähnlichem entsprechend Standardverfahren (8) markiert. Als Standardmaterial für den Immunoassay wurde recombinantes proANP (1-98) exprimiert in E. Coli vom

30

Institut für Mikrobiologie der Universität Wien verwendet.

Folgendes Protokoll stellt einen typischen Assay-Vorgang dar:

5 Mikrotiterplatten (Nunc Maxisorp High Binding, NUNC, Dänemark) werden über Nacht bei 4°C mit 200µl Antiserum-Verdünnung (Erstserum) gegen beispielsweise Immunogen 1 beschichtet. Die unspezifischen Bindungsstellen werden blockiert und Standard oder Probe mit biotinmarkiertem Antiserum gegen z.B. Immunogen 3 im Well gemischt. Nach 2h bei 37°C werden die Wells gewaschen  
10 und Streptavidin-Peroxidase Konjugat zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei 37°C und einem weiteren Waschschrift wird Tetramethylbenzidin (TMB) zugesetzt und schließlich die der proANP (1-98) Konzentration der Probe proportionale Farbentwicklung in einem Mikrotiterplatten- Photometer bestimmt.

#### 15 Beispiel 2

Direkter Fluoreszenzimmunoassay für proANP (1-98)

In einer weiteren Ausführung der Erfindung können Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorescein, Rhodamin etc. ) als Marker für beispielsweise das Antiserum gegen  
20 Immunogen 3 eingesetzt werden. Die Assaydurchführung kann dann analog Beispiel 1 ohne die Notwendigkeit einer Substratzugabe erfolgen. Weiters können die fluoreszenzmarkierten Antisera zu histochemischen Studien betreffend die proANP (1-98) - Verteilung in Geweben eingesetzt werden (Konfokale-Laser-Mikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie etc.)

25

#### Beispiel 3

Homogener Immunoassay für proANP (1-98)

In einer weiteren Ausführung der Erfindung werden die Antikörper des Erstserums an Kunststoffpartikel (Latex, Polystyrol etc.) gebunden und gemeinsam mit dem markierten Zweitantikörper der Probe in homogener Lösung zugesetzt. Nach einem Trennungsschritt durch Filtration oder Zentrifugation wird die Menge an gebundenen Zweitantikörper durch Farbreaktion mit geeigneten Enzymsubstrat mit einem herkömmlichen Spektral-Photometer bestimmt

TABELLE 1

10	Parameter	% Signal im proANP (1-98) -Sandwich ELISA
	proANP (1-98)	100,00
	proANP (1-30)	< 1
	proANP (31-67)	< 3
	proBNP (8-29)	< 1
	proBNP (32-57)	< 1
15	proCNP (24-42)	< 1
	proCNP (53-73)	< 1
	proCNP (74-102)	< 1
	$\alpha$ -ANP (1-28)	< 1

20

25

30

## 7. Literatur

- 5 1. de Bold A.J. et al. (1981), Life Sci, 28: 89-94
2. Yandle T.G. et al. (1986), Life Sci. 38: 1827-1833
3. Mathisen P. et al. (1991), Scand.J. Clin.Lab. Invest. 53: 41-49
4. Wie C.M. (1993), Circulation 88: 1004-1009
5. Nicholls M.G. et al. (1996), JIFCC 8: 159-160
- 10 6. Bonow R. et al. (1996), Circulation 93: 1946-1950
7. Nakao K. et al (1996), Current Opinion in Nephrology and Hypertension 5:  
4-11
8. Francis G.S. et al (1990), Circulation 82: 1724-1729
9. Lerman A. et al. (1993), Lancet 341: 1105-1109
- 15 10. Rouleau J.L. et al. (1994), J. Am. Coll. Cardiol. 24: 583-591
11. Hall C. et al. (1994), Circulation 89: 1934-1942
12. Dagobatti et al. (1997), Cardiovascular Research 36: 246-255
13. Hoffmann K. et al , (1982) Biochemistry, 21: 978

20

25

30

## Patentansprüche:

5

1. Verfahren zur Bestimmung von Atrialelem Natriuretischem Peptid (ANP), dadurch gekennzeichnet, daß polyklonale Antikörper gegen Epitope des pro ANP (1 - 98) eingesetzt werden, die als Immunogene 1, 2 und 3 (SEQ.ID.Nr. 1, 2 und 3) 10 definiert sind, und die diese Immunogene sowie rekombinantes pro ANP (1 - 98) spezifisch binden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Antikörper mit einem Marker-Molekül versehen werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als 15 Markermolekül eine fluoreszierende Substanz, ein Enzym oder ein Farbstoff eingesetzt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß zum Nachweis von humanem oder tierischen pro ANP (1 - 98) Körperflüssigkeit mit einer Lösung, die einen der polyklonalen Antikörper gegen Immunogen 1, 2 oder 3 20 enthält, zur Bildung eines Antikörper/pro ANP(1 - 98)-Komplexes in Kontakt gebracht wird, wonach dann die Bildung des Komplexes nachgewiesen wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis des Antikörper/pro ANP(1 - 98)-Komplex durch Reaktion mit einem der beiden anderen Antikörper in Form eines Sandwich-Assays durchgeführt wird.

25 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein primärer, gegen eines der Immunogene gemäß Anspruch 1 gerichteter Antikörper an einer Festphase immobilisiert wird, wobei zur Reaktion als sekundärer Antikörper einer der gegen eines der beiden übrigen Immunogene gerichteten Antikörper eingesetzt wird.

30

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der primäre Antikörper an einer Mikrotiterplatte, einer Membrane oder Festkörperpartikeln immobilisiert wird.

8. Kit für Immunoassays zur Durchführung des Verfahrens nach einem der 5 Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Komponenten enthält:

- a) einen immobilisierten primären Antikörper gemäß Anspruch 6,
- b) rekombinantes pro ANP (1 - 98) als Standard,
- c) einen polyklonalen sekundären Antikörper gemäß Anspruch 6, oder einen markierten Detektionsantikörper, der spezifisch an den genannten polyklonalen 10 sekundären Antikörper bindet.

9. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 4 bis 7 zur in vitro Diagnose und/oder Prognose von Herzerkrankungen in der Human- oder Veterinärmedizin, wobei die im Vergleich mit gesunden Organismen erhöhte Konzentration von pro ANP (1 - 98) auf eine Herzerkrankung hinweist.

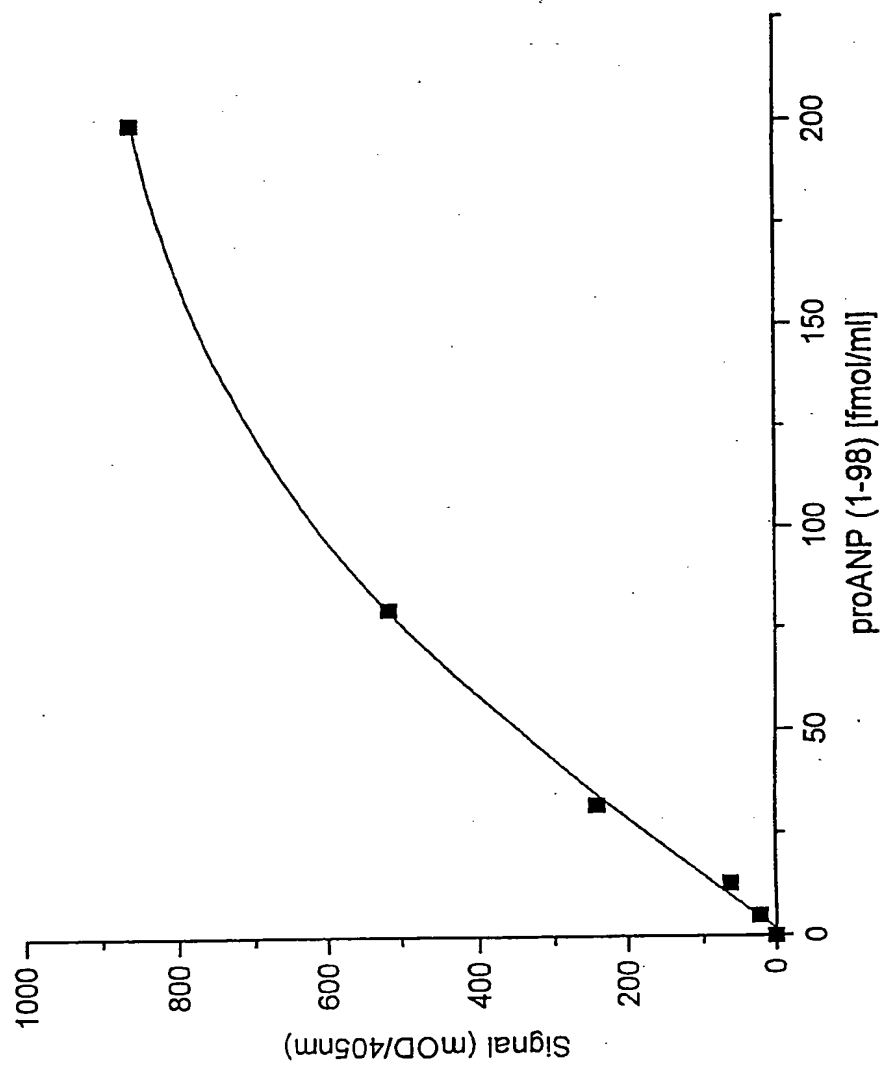
15

20

25

30





Figur 1

Figur 2

